

TRAITE ~~DE~~ COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT  
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et  
instruction administrative 422 du PCT)

Destinataire:

VIEILLEFOSSE, Jean-Claude  
Aventis Pharma S.A.  
Département des Brevets  
102, route de Noisy  
F-93235 Romainville Cedex  
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 20 février 2001 (20.02.01)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 2520/PCT	
Demande internationale no PCT/FR00/01937	Date du dépôt international (jour/mois/année) 06 juillet 2000 (06.07.00)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:		
<input checked="" type="checkbox"/> le déposant	<input type="checkbox"/> l'inventeur	<input type="checkbox"/> le mandataire <input type="checkbox"/> le représentant commun
Nom et adresse HOECHST MARION ROUSSEL 1, Terrasse Bellini F-92800 Puteaux FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de télécopieur	
2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:		
<input type="checkbox"/> la personne	<input checked="" type="checkbox"/> le nom	<input checked="" type="checkbox"/> l'adresse <input type="checkbox"/> la nationalité <input type="checkbox"/> le domicile
Nom et adresse AVENTIS PHARMA S.A. 20, avenue Raymond Aron F-92160 Antony FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de télécopieur	
3. Observations complémentaires, le cas échéant: <b>Ce changement de nom s'applique également à l'adresse du mandataire, comme indiqué dans le cadre destinataire ci-dessus.</b>		
4. Une copie de cette notification a été envoyée:		
<input checked="" type="checkbox"/> à l'office récepteur	<input checked="" type="checkbox"/> aux offices désignés concernés	
<input type="checkbox"/> à l'administration chargée de la recherche internationale	<input type="checkbox"/> aux offices élus concernés	
<input type="checkbox"/> à l'administration chargée de l'examen préliminaire international	<input type="checkbox"/> autre destinataire:	

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé: Fiona DOHERTY
no de télécopieur (41-22) 740.14.35	no de téléphone (41-22) 338.83.38

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

## NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner  
 US Department of Commerce  
 United States Patent and Trademark  
 Office, PCT  
 2011 South Clark Place Room  
 CP2/5C24  
 Arlington, VA 22202  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
 en sa qualité d'office élu

<b>Date d'expédition</b> (jour/mois/année) 23 mars 2001 (23.03.01)	
<b>Demande internationale no</b> PCT/FR00/01937	<b>Référence du dossier du déposant ou du mandataire</b> 2520/PCT
<b>Date du dépôt international</b> (jour/mois/année) 06 juillet 2000 (06.07.00)	<b>Date de priorité</b> (jour/mois/année) 08 juillet 1999 (08.07.99)
<b>Déposant</b> DUMAS, Jacques etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

20 janvier 2001 (20.01.01)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI  
 34, chemin des Colombettes  
 1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Kiwa Mpay

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

10/030230

Applicant's or agent's file reference 2520/PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/01937	International filing date (day/month/year) 06 July 2000 (06.07.00)	Priority date (day/month/year) 08 July 1999 (08.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 14/535		
Applicant AVENTIS PHARMA S.A.		

1.	This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2.	This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.  <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).  These annexes consist of a total of _____ sheets.
3.	This report contains indications relating to the following items:  I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 20 January 2001 (20.01.01)	Date of completion of this report 30 October 2001 (30.10.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/01937

## I. Basis of the report

### 1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
 pages 1-16, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
 pages 1-17, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the drawings:  
 pages 1/7-7/7, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

### 2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

### 3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

### 4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

### 5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-17	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-17	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-17	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations**

1. In the present international preliminary examination report, reference is made to the following documents:

D1: Database Biosis, AN: PREV199598171086  
(concerning the publication "Archives of Biochemistry and Biophysics, 1995, Arakawa et al" (cited in the application)).

D2: US-A-5 861 150

- 2.1 In view of the prior art, the subject matter of Claims 1-17 can be considered to be novel (PCT Article 33(2)).

The invention relates to a method for purifying the granulocyte colony stimulation factor (G-CSF). According to said method, said G-CSF factor is weakly bound to the hydroxyapatite support, whereas the contaminating proteins in the solution containing the G-CSF are strongly bound to hydroxyapatite and retained during elution of the G-CSF. Such a method has not been described in the prior art.

- 2.2 However, it would appear that the subject matter of Claims 1-17 does not involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

The prior art represented by D1 (also cited in the application) already described the use of hydroxyapatite as a means for purifying the G-CSF factor; nevertheless, as the applicant points out in the application (see page 4, lines 27-35), the method of the invention does not make use of hydroxyapatite in the same way as the method described by Arakawa in D1.

In our opinion, since hydroxyapatite is a well-known purifying means and has already been successfully used to purify CSF factors (see D2), and in particular G-CSF (D1), a novel method using hydroxyapatite in a different manner, as defined in the present claims, is neither surprising nor unexpected, but results from a simple routine procedure that does not need to overcome any technical prejudice. The same applies to the other technical features (elution buffer, pH, etc.), which are well-known to a person skilled in the art and are used in the method claimed. Hence, there do not seem to be any arguments in favour of recognising an inventive step in the subject matter of these claims (PCT Article 33(3)).

3. Claims 13 and 14 are unclear and are not entirely supported by the description (PCT Article 6).

(a) Including the G-CSF purification method in a "multistage purification" method is an aim to be

achieved. The subject matter of Claim 13 cannot be defined solely by designating this aim without specifying the means for achieving same, i.e. without indicating the technical features whereby said method can be included in such a multistage purification method (see also PCT Rule 6.3(b)).

(b) Moreover, the meaning of said "multistage purification" method does not appear clearly from the definition of said claims, and it does not appear to be possible, under the terms of the description, to consider that any so-called "multistage purification method" could be covered by the claimed subject matter. Consequently, said claims are unclear and are not entirely supported by the description.

4. Contrary to the requirements of PCT Rule 5.1(a)(ii), the description does not cite the prior art document D2.

2520 / WO

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
18 janvier 2001 (18.01.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 01/04154 A1

(51) Classification internationale des brevets:  
C07K 14/535, 1/20

(74) Mandataire: VIEILLEFOSSE, Jean-Claude; Hoechst  
Marion Roussel, 102, route de Noisy, F-93235 Romainville  
Cedex (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:  
PCT/FR00/01937

(81) États désignés (*national*): AE, AG, AL, AU, BA, BB, BG,  
BR, BZ, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, DZ, EE, GD, GE, HR,  
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MA,  
MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT,  
UA, US, UZ, VN, YU, ZA.

(22) Date de dépôt international: 6 juillet 2000 (06.07.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:  
99/08831 8 juillet 1999 (08.07.1999) FR

(84) États désignés (*régional*): brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,  
MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,  
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*):  
HOECHST MARION ROUSSEL [FR/FR]; 1, Terrasse  
Bellini, F-92800 Puteaux (FR).

**Publiée:**

- Avec rapport de recherche internationale.
- Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*): DUMAS,  
Jacques [FR/FR]; 104, Avenue Gabriel Péri, F-94170  
Le Perreux sur Marne (FR). REY, Lucien [FR/FR]; 34,  
Avenue de la République, F-94700 Maisons Alfort (FR).  
SARUBBI, Edoardo [IT/FR]; 16 bis, rue de Neuilly,  
F-94120 Fontenay sous Bois (FR).

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.*

(54) Title: METHOD FOR PURIFYING GRANULOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR

(54) Titre: PROCEDE DE PURIFICATION DE FACTEUR DE STIMULATION DE COLONIES DE GRANULOCYTES

(57) Abstract: The invention concerns a method for purifying G-CSF from a biological sample comprising steps which consist in: a) reducing the volume of the biological sample containing the G-CSF by hydrophobic interaction chromatography to obtain a concentrated, desalted and enriched fraction; b) passing the concentrated fraction over hydroxyapatite in conditions whereby the G-CSF is slightly bound to obtain a concentrated, desalted and enriched fraction containing the G-CSF; and c) collecting the G-CSF.

(57) Abrégé: L'invention a pour objet un procédé de purification de G-CSF à partir d'un échantillon biologique comprenant les stades de: a) réduire le volume de l'échantillon biologique contenant le G-CSF par chromatographie par interaction hydrophobe pour obtenir une fraction concentrée, dessalée et enrichie; b) passer la fraction concentrée sur hydroxyapatite dans les conditions où le G-CSF est faiblement lié pour obtenir une fraction concentrée, dessalée et enrichie contenant le G-CSF c) et; recueillir le G-CSF.

WO 01/04154 A1



Procédé de purification de facteur de stimulation  
de colonies de granulocytes.

La présente invention concerne un procédé de purification d'un facteur de stimulation de colonies de granulocytes (noté G-CSF pour "Granulocyte Colony Stimulating Factor") par chromatographie utilisant un stade de chromatographie sur hydroxyapatite.

Parmi les facteurs de stimulation de colonies qui régulent la différenciation et la prolifération des cellules hématopoïétiques de mammifères, les facteurs de stimulation des colonies de granulocytes ont été décrits par exemple dans la demande de brevet internationale WO 87/01132 ou la demande de brevet européenne EP169566.

La préparation de G-CSFs de différentes origines et leur purification ont été décrites dans de nombreuses publications scientifiques ou demandes de brevet. Par exemple, la demande de brevet européenne EP 243153 a décrit un procédé de purification de G-CSF humain à partir de lignées de cellules de carcinome de vessie HBT5637 ; la demande de brevet européenne EP215126 a décrit la purification de G-CSF humain recombinant produit dans *E. coli*. Les procédés décrits ci-dessus correspondent à de multiples stades de purification dans lesquels la concentration initiale des préparations biologiques de départ est généralement obtenue par les méthodes classiques d'ultrafiltration ou de précipitation par un sel, suivies de chromatographies liquides en phase inverse (noté RP-HPLC) successives qui ont l'inconvénient connu de conduire à des pertes de rendement importantes, par exemple parce que la protéine est dénaturée par les solvants organiques. Par ailleurs, le brevet américain US 5,055,555 a décrit un procédé sélectif et simplifié de purification de G-CSF recombinant humain produit dans une levure à plus grande échelle, par précipitation par NaCl précédée d'une concentration par chromatographie sur une colonne d'échangeur de cations (S Sepharose® ou Mono S®), mais dont le rendement et la pureté obtenus ne sont pas mentionnés.

De plus, quelques utilisations de stades de chromatographie, autre que la RP-HPLC, ont été aussi décrites

pour la purification de G-CSFs :

L'utilisation de Phenyl Sepharose® CL-6B (Pharmacia) a été décrite par N A. Nicola et al., Journal of Biological Chemistry, Vol. 258, p. 9017-9023, 1983 pour la purification  
5 de G-CSF produit naturellement par des cellules leucémiques murines. Après concentration préliminaire du milieu sur fibre creuse et chromatographie "salting out", le G-CSF a été directement fixé sur la colonne de Phenyl Sepharose®, puis élué en utilisant un gradient décroissant de sel, puis un  
10 gradient linéaire d'éthylène glycol.

L'utilisation d'hydroxyapatite a été décrite par T. Arakawa et al., Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol. 316, p. 285-289, 1995 comme dernier stade de purification de G-CSF produit à partir de cellules CHO transformées.

15 L'utilisation de SP Sepharose® Fast Flow (Pharmacia) a été décrite par S-H Kang et al., Biotechnology Letters, Vol. 17, p. 687-692, 1995 pour la purification de G-CSF produit à partir de cellules d'E. coli transformées. Après solubilisation des corps d'inclusion et renaturation, le G-CSF a été  
20 élué en utilisant un gradient de NaCl variant de 0 à 0,5 M.

L'un des objets de la présente invention est de fournir un procédé qui permet d'isoler et de purifier des G-CSFs, à une grande échelle et avec des rendements élevés, par un stade de chromatographie sur hydroxyapatite à partir  
25 d'échantillons biologiques préalablement concentrés et enrichis en utilisant une chromatographie par interaction hydrophobe.

Le procédé de l'invention peut être utilisé par exemple comme premier stade de purification d'un G-CSF dans un  
30 procédé multistade de préparation d'un G-CSF ayant une pureté permettant une utilisation clinique.

L'invention a pour objet un procédé de purification de G-CSF à partir d'un échantillon biologique comprenant les stades de

- 35 a) réduire le volume de l'échantillon biologique contenant le G-CSF par chromatographie par interaction hydrophobe pour obtenir une fraction concentrée, dessalée et enrichie,  
b) passer la fraction concentrée sur hydroxyapatite dans des

conditions où le G-CSF est faiblement lié pour obtenir une fraction concentrée, dessalée et enrichie contenant le G-CSF et

c) recueillir le G-CSF.

- 5 Le procédé ci-dessus permet de purifier le G-CSF dans des conditions non dénaturantes et d'isoler le G-CSF biologiquement actif.

Le G-CSF purifié selon le procédé de l'invention peut être tout G-CSF connu ayant un intérêt biologique et  
10 pharmaceutique. Par G-CSF, on inclut un G-CSF produit constitutivement par des cellules, par exemple par des lignées cellulaires établies à partir de cellules tumorales tel que décrit par Watson et al., J. Immunol., Vol. 137, p. 854-857, 1986, un G-CSF produit par activation du gène du  
15 G-CSF (noté GA-GCSF pour "Gene Activation-GCSF") dans des cellules humaines tel que décrit dans la demande de brevet internationale WO 95/31560 ou un G-CSF produit par la technologie de l'ADN recombinant par des cellules hôtes. Les cellules hôtes peuvent être des cellules eucaryotes telles  
20 que des cellules de mammifères, par exemple des cellules COS de singe, des cellules CHO de hamster ou des cellules C127 de souris ou telles que des levures, par exemple *S. cerevisiae* ou des cellules procaryotes, par exemple *E. coli*. Des exemples de G-CSF recombinants ont été décrits, par exemple  
25 dans la demande de brevet européenne EP217404 qui décrit un G-CSF produit dans des cellules C127 ou dans des cellules CHO, dans le brevet US 5,055,555 qui décrit un G-CSF produit par *S. cerevisiae* ou dans la demande de brevet internationale WO 87/01132 qui décrit un G-CSF produit dans les cellules COS  
30 ainsi qu'un G-CSF produit dans *E. coli*. Le procédé permet de purifier aussi bien des G-CSFs glycosylés ou non glycosylés.

L'échantillon biologique à partir duquel le procédé de l'invention permet de purifier un G-CSF comprend les fluides biologiques de cultures cellulaires tels que des lysats de  
35 cellules, des corps d'inclusion ou des surnageants de cultures lorsque le G-CSF est excrété. L'échantillon biologique utilisé pour la purification du G-CSF a été de préférence préalablement séparé des cellules ou des débris

cellulaires par les méthodes connues de l'homme du métier, par exemple par filtration, par centrifugation ou par ultrafiltration.

Par chromatographie par interaction hydrophobe, on entend une chromatographie sur un support de séparation de substances sur la base de leurs différences d'interaction avec des groupes hydrophobes attachés sur une matrice sans groupes ioniques. Le groupe hydrophobe peut-être un ligand aliphatique, par exemple un groupe butyle ou octyle ou un ligand aromatique, par exemple un groupe phényle ou un groupe phénylbutylamine et la matrice est en général un gel, par exemple de l'agarose tel que Sepharose®. Les supports utilisés sont des produits commercialisés. Dans tous les procédés d'utilisation de la chromatographie par interaction hydrophobe, la fixation des protéines au gel hydrophobe est réalisée en présence de hautes concentrations en sels. De façon tout à fait inattendue et avantageuse, le procédé de l'invention comprend une chromatographie par interaction hydrophobe caractérisée par une fixation de la protéine à faible conductivité ou à faible teneur en sel, par exemple le sulfate d'ammonium ou du NaCl, et permet de réduire le volume de l'échantillon biologique initial tout en éliminant les sels ainsi qu'un pourcentage élevé des protéines contaminantes. Le procédé de l'invention permet donc d'obtenir une fraction concentrée, dessalée et enrichie en G-CSF non dénaturé qui est ensuite passée sur hydroxyapatite.

Contrairement à l'utilisation de l'hydroxyapatite comme stade final de purification décrite par T. Arakawa et al., 1995 ci-dessus, dans lequel le G-CSF est recueilli dans la fraction non fixée sur de l'hydroxyapatite équilibrée dans un tampon phosphate 10 mM contenant NaCl 0,1 M à pH 7,0, le procédé de l'invention utilise des conditions où le G-CSF est faiblement lié à l'hydroxyapatite et permet ainsi de recueillir une solution concentrée et dessalée de G-CSF purifié.

L'invention a particulièrement pour objet le procédé ci-dessus dans lequel le G-CSF recueilli a une pureté d'au moins 90 %.

L'invention a aussi particulièrement pour objet le procédé ci-dessus dans lequel l'échantillon biologique est un surnageant de culture cellulaire ainsi que le procédé dans lequel le G-CSF est un G-CSF humain (noté hG-CSF).

5 L'invention a aussi particulièrement pour objet le procédé ci-dessus dans lequel le stade de réduction de volume comprend la mise en contact de l'échantillon biologique sur un support de chromatographie par interaction hydrophobe de type phényle dans des conditions permettant la fixation du  
10 G-CSF, puis son élution.

L'invention a plus particulièrement pour objet le procédé ci-dessus dans lequel le support de type phényl est un Phenyl Sepharose®.

L'invention a spécialement pour objet le procédé ci-  
15 dessus dans lequel la fixation sur Phenyl Sepharose® est effectuée dans un tampon ayant une force ionique comprise entre 0 et 60 mSi et l'élution est effectuée par diminution de la force ionique ou de la concentration en sel dans le tampon de fixation.

20 L'invention a aussi spécialement pour objet le procédé ci-dessus dans lequel la fixation sur Phenyl Sepharose® est effectuée dans un tampon contenant du NaCl à une concentration comprise entre 0,1 et 1 M.

L'invention a plus spécialement pour objet le procédé ci-  
25 dessus dans lequel la fixation sur Phenyl Sepharose® est effectuée dans un tampon contenant du NaCl à une concentration comprise entre 0,1 et 0,5 M et l'élution est effectuée par de l'eau.

Des exemples d'utilisation de la chromatographie par  
30 interaction hydrophobe sur Phenyl Sepharose® illustrant le procédé de l'invention sont décrits plus loin dans la partie expérimentale.

L'invention a aussi particulièrement pour objet le procédé de l'invention ci-dessus dans lequel le stade de  
35 passage sur hydroxyapatite est effectué dans un tampon de force ionique comprise entre 2 et 30 mSi et à un pH compris entre 5,5 et 7,5.

L'invention a plus particulièrement pour objet le

procédé ci-dessus dans lequel le tampon comprend du phosphate à une concentration comprise entre 1 et 10 mM.

L'invention a aussi plus particulièrement pour objet le procédé ci-dessus dans lequel le tampon est un tampon  
5 phosphate 1 mM et le pH est compris entre 6,0 et 7,5.

Des exemples d'utilisation d'hydroxyapatite à la suite d'une chromatographie sur Phenyl Sepharose® illustrant le procédé de l'invention sont décrits plus loin dans la partie expérimentale.

10 L'invention concerne aussi un procédé de purification de G-CSF pouvant être inclus dans un procédé multistade de purification du G-CSF à partir d'un échantillon biologique comprenant les stades de

- a) réduire le volume de l'échantillon biologique contenant  
15 le G-CSF par chromatographie par interaction hydrophobe pour obtenir une fraction concentrée, dessalée et enrichie,
- b) passer la fraction concentrée sur hydroxyapatite dans des conditions où le G-CSF est faiblement lié pour obtenir une fraction concentrée, dessalée et enrichie contenant le G-CSF  
20 et
- c) recueillir le G-CSF.

L'invention concerne particulièrement le procédé ci-dessus dans lequel le procédé multistade comprend en outre un ou plusieurs stades de chromatographie choisis parmi le  
25 groupe constitué de chromatographie d'échange d'ions, de gel filtration, de phase inverse ou d'affinité.

Des exemples de stades de chromatographie d'échange d'ions et de gel filtration illustrant l'utilisation du procédé de l'invention dans un procédé multistade de  
30 purification de G-CSF sont décrits plus loin dans la partie expérimentale.

L'invention concerne aussi un procédé pour éliminer des protéines contaminantes à partir d'une solution contenant du G-CSF et des protéines contaminantes comprenant :

- 35 a) le passage de la solution sur hydroxyapatite par lequel les protéines contaminantes sont fixées à l'hydroxyapatite et le G-CSF est faiblement lié et
- b) l'élution du G-CSF.

L'invention concerne particulièrement le procédé ci-dessus dans lequel l'élution du G-CSF est effectuée par simple lavage avec le tampon de fixation.

Les protéines contaminantes présentes dans les solutions  
5 contenant du G-CSF ont été par exemple ajoutées dans les milieux de culture cellulaire. Les protéines ajoutées peuvent être par exemple du sérum, tel que du sérum de boeuf ou du sérum foetal de veau, par exemple des protéines de sérum partiellement purifiées, telles que de l'albumine ou de la  
10 transferrine ou des mélanges de celles-ci.

Le procédé de l'invention permet d'éliminer ces protéines contaminantes par un passage de la solution contenant du G-CSF sur hydroxyapatite au cours duquel les protéines indésirables sont fortement fixées sur le support  
15 et retenues pendant l'élution du G-CSF.

L'invention concerne aussi particulièrement le procédé ci-dessus dans lequel la solution contenant le G-CSF est préparée par chromatographie par interaction hydrophobe d'un échantillon biologique contenant du G-CSF.

20 De préférence, la chromatographie par interaction hydrophobe est réalisée sur un support de type phényle, par exemple sur Phenyl Sepharose® comme cela est illustré plus loin dans la partie expérimentale. Le procédé de l'invention permet de façon avantageuse d'éliminer ces protéines  
25 contaminantes au cours du premier stade de purification de G-CSF à partir d'un échantillon biologique.

#### **Méthodes analytiques**

##### **1. Dosage de G-CSF par HPLC**

Les fractions recueillies après chromatographie ont été  
30 analysées par RP-HPLC analytique sur une colonne Vydac C4 (0,46 x 15), 300Å, 5 microns, équilibrée dans H<sub>2</sub>O/TFA 0,1 %, au débit de 2 ml/mn avec un gradient linéaire d'acétonitrile/TFA 0,1 % variant de 40 à 80 % sur 10 minutes, et une détection spectrophotométrique à 214 nm.

35 Le G-CSF est élué à une concentration d'environ 65 % d'acétonitrile. La concentration en G-CSF est mesurée par rapport à un standard de G-CSF. Une évaluation de la pureté est mesurée par le rapport de la surface du pic de G-CSF à la

surface de l'ensemble des pics autres que le pic d'injection.

## 2. Dosage de G-CSF par ELISA

La concentration en G-CSF est mesurée en utilisant la trousse ELISA de R&D System Inc et le protocole recommandé par le

5 fournisseur.

## 3. SDS-PAGE

Les échantillons sont analysés sur des gels de polyacrylamide prêts à l'emploi (Novex) contenant un gradient de 10 à 20 % de polyacrylamide et une coloration à l'argent  
10 en utilisant la trousse Silver staining de Biorad pour un dépôt de 50 ng à 1µg de G-CSF.

Les figures ci-annexées illustrent certains aspects de l'invention.

La figure 1 est un chromatogramme montrant le  
15 fractionnement sur phényl Sepharose d'un surnageant de cellules exprimant GA-GCSF et contenant NaCl 0,1 M. Les unités arbitraires représentent respectivement la conductivité et la densité optique (DO) de l'effluent de la colonne exprimées en pourcentage.

20 La figure 2 est un chromatogramme montrant le fractionnement sur phényl Sepharose d'un surnageant de cellules exprimant GA-GCSF et contenant NaCl 0,5 M. Les unités arbitraires ont la même signification qu'à la figure 1.

La figure 3 est un chromatogramme montrant le  
25 fractionnement de GA-GCSF sur hydroxyapatite MacroPrep® ceramic Type I après phényl Sepharose. Les unités arbitraires ont la même signification qu'à la figure 1.

La figure 4 est un chromatogramme de RP-HPLC analytique de GA-GCSF après phényl Sepharose et hydroxyapatite Type I.

30 La figure 5 est un chromatogramme montrant le fractionnement de GA-GCSF sur hydroxyapatite MacroPrep® ceramic Type II après phényl Sepharose. Les unités arbitraires ont la même signification qu'à la figure 1.

La figure 6 est un chromatogramme de RP-HPLC analytique  
35 de GA-GCSF après phényl Sepharose et hydroxyapatite Type II.

La figure 7 représente l'analyse par SDS-PAGE de la purification de GA-GCSF successivement dans un surnageant de culture filtré (puits 3), un éluat de phényl Sepharose (puits



4), un éluat d'hydroxyapatite (puits 5), un éluat de SP Sepharose (puits 6), un concentrat UF (puits 7), un éluat de gel filtration en tampon PBS (puits 9), un éluat de gel filtration en tampon acétate pH 5,5 (puits 11) avec des  
5 marqueurs standards de poids moléculaires (puits 1). La bande correspondant au PM apparent du GA-GCSF est indiquée par une flèche.

**Exemple 1** : Concentration d'un échantillon biologique de G-CSF par chromatographie sur phényl Sepharose.

10 Le matériel de départ est le surnageant de centrifugation d'un bouillon de culture de lignées cellulaires humaines exprimant un GA-GCSF humain obtenu selon la demande de brevet internationale WO95/31560 dans un bioréacteur à fibres creuses Endotronics® dans le milieu DMEM/F12 (Hyclone)  
15 contenant 0,9 % de sérum foetal de veau. Après centrifugation, le surnageant a été conservé à -20°C avant utilisation.

Le surnageant décongelé a été chromatographié sur phényl Sepharose après addition de NaCl q.s.p. 0,1 M et filtration  
20 sur une membrane Millipore de 0,22 µm, à une température d'environ 15 à 20°C.

En utilisant une colonne Pharmacia XK16 (1,6 cm x 40 cm) garnie de 50 ml de Phenyl Sepharose® Fast Flow High Substitution (Pharmacia ), conservée sous éthanol à 25 %,   
25 puis lavée à l'eau déminéralisée Milli-Q avant utilisation, puis équilibrée par une solution de NaCl 0,1M, la concentration par chromatographie sur phényl Sepharose a été effectuée de la façon suivante :

2295 ml de surnageant salé et filtré obtenu ci-dessus  
30 (conductivité 17,7 mS.cm<sup>-1</sup>) sont appliqués sur la colonne au débit de 13 ml/mn en recueillant l'effluent de la colonne en fractions de 500 ml. La colonne est ensuite lavée au débit de 4 ml/mn avec 220 ml de solution NaCl 0,05 M en recueillant l'effluent de la colonne en fractions de 40 ml. La colonne  
35 est ensuite éluée au même débit avec 150 ml d'eau déminéralisée Milli-Q en recueillant l'effluent de colonne en fractions de 2 ml. La colonne est enfin régénérée par un lavage au même débit avec une solution d'urée 8 M.

Les protéines totales dans l'effluent de la colonne sont détectées par absorption à 280 nm et la concentration en sel est suivie à l'aide d'un conductimètre. La présence dans l'effluent de colonne d'un premier pic de protéine éluée par l'eau, puis d'un deuxième pic de protéine éluée par le lavage à l'urée est montrée à la figure 1.

Les fractions recueillies pendant l'élution à l'eau ont été analysées pour leur teneur en G-CSF par chromatographie RP-HPLC analytique et par ELISA en utilisant les conditions décrites précédemment. Les fractions contenant le G-CSF réunies (40 ml) contiennent 29,3 mg de GA-GCSF titrés par HPLC correspondant à un rendement de 56 % et une pureté de 58 %.

La solution de phényl Sepharose de GA-GCSF ainsi obtenue a une conductivité de  $0,161 \text{ mS.cm}^{-1}$ .

**Exemple 2** : Chromatographie sur phényl Sepharose, puis sur hydroxyapatite comme premier stade de purification de G-CSF.

Le matériel de départ est le surnageant d'un bouillon de culture de lignées cellulaires humaines exprimant un GA-GCSF humain obtenu comme à l'exemple 1 mais en utilisant un bioréacteur de 5 litres au lieu d'un bioréacteur Endotronics®. Le surnageant décongelé a été chromatographié sur phényl Sepharose après addition de NaCl qsp 0,5 M et filtration sur une membrane Millipore 0,45  $\mu\text{m}$ .

En utilisant une colonne Pharmacia XK16 garnie de 50 ml de Phenyl Sepharose® Fast Flow High Substitution (Pharmacia) conservée sous éthanol à 25 %, puis lavée à l'eau déminéralisée Milli-Q avant utilisation, la concentration par chromatographie sur phényl Sepharose a été effectuée de la façon suivante :

1640 ml de surnageant salé et filtré obtenu ci-dessus (conductivité  $56,3 \text{ mS.cm}^{-1}$ ) sont appliqués sur la colonne au débit de 4 ml/mn et l'effluent de la colonne est recueilli en fractions de 400 ml. La colonne est ensuite éluée au même débit de 4 ml/mn avec 240 ml de NaCl 0,5M en recueillant l'effluent de la colonne en fractions de 40 ml. La colonne est ensuite éluée au même débit avec 150 ml d'eau déminéralisée Milli-Q en recueillant l'effluent de la colonne

en fractions de 2 ml. La colonne est enfin régénérée par un lavage au même débit avec une solution d'urée 8M.

Les protéines totales dans l'effluent de colonne et la concentration en sel sont détectées comme à l'exemple 1. La présence dans l'effluent de colonne d'un premier pic de protéine éluée par le lavage à l'eau, puis d'un deuxième pic de protéine éluée par le lavage à l'urée est montrée à la figure 2.

Les fractions recueillies pendant l'élution à l'eau ont été analysées pour leur teneur en G-CSF par chromatographie RP-HPLC analytique et par ELISA. Les fractions contenant le G-CSF réunies (50 ml) contiennent 45,1 mg de GA-GCSF titrés par HPLC correspondant à un rendement de 90 % avec une pureté de 61 %.

La solution de phényl Sepharose de GA-GCSF ainsi obtenue a une conductivité de 4,22 mS.cm<sup>-1</sup> qui permet de l'utiliser telle quelle dans le stade suivant de chromatographie sur hydroxyapatite.

En utilisant une colonne Pharmacia XK16 garnie de 29 g d'hydroxyapatite Macro-Prep® Ceramic, Type I (Bio-rad), préalablement mise en suspension dans le tampon phosphate de sodium 250 mM à pH 7,3 (tampon 250 mM, pH 7,3), puis équilibrée par percolation au débit de 5 ml/mn de 500 ml du tampon 250 mM dilué au 1/250 (tampon 1 mM, pH 7,3), la chromatographie sur hydroxyapatite a été effectuée de la façon suivante :

24 ml de la solution de phényl Sepharose de GA-GCSF obtenue ci-dessus, puis conservée une nuit à +2°C, sont appliqués sur la colonne d'hydroxyapatite au même débit. La colonne est ensuite éluée avec 150 ml du tampon 1 mM, pH 7,3, puis régénérée par un lavage avec le tampon 250 mM, pH 7,3 au même débit en recueillant l'effluent de colonne en fractions de 5ml. Les protéines totales dans l'effluent de la colonne et la concentration en sel sont détectées comme à l'exemple 2.

La présence dans l'effluent de colonne d'un pic de protéine éluée par le tampon 1 mM, pH 7,3, puis d'un deuxième pic de protéine éluée par le tampon 250 mM, pH 7,3 est montrée à la figure 3.

Les fractions recueillies pendant l'élution par le tampon 1 mM, pH 7,3 ont été analysées par RP-HPLC analytique et par ELISA. Les fractions 25 à 49 réunies (25 ml) contiennent 21,3 mg de GA-GCSF titrés par HPLC correspondant à un rendement de 98,4 % avec une pureté de 97,8 % et donne un pic homogène en HPLC (figure 4).

**Exemple 3** : Chromatographie sur phényl Sepharose, puis sur hydroxyapatite comme premier stade de purification de G-CSF. 24 ml de la solution de GA-GCSF de phényl Sepharose obtenue à l'exemple 2 ont été chromatographiés sur une colonne d'hydroxyapatite selon les conditions décrites à l'exemple 2, mais en utilisant l'hydroxyapatite Macro-Prep® Ceramic de Type II (Biorad) au lieu de Type I.

La présence dans l'effluent de colonne d'un premier pic de protéine éluée par le tampon 1 mM, pH 7,3, puis d'un deuxième pic de protéine éluée par le tampon 250 mM, pH 7,3 est montrée à la figure 5. Les fractions recueillies pendant l'élution par le tampon 1 mM, pH 7,3 ont été analysées par RP-HPLC analytique et par ELISA. Les fractions réunies (25 ml) contiennent 21,7 mg de GA-GCSF titrés par HPLC correspondant à un rendement de 100,2 % avec une pureté de 94,5 % et donne un pic homogène en HPLC (figure 6).

**Exemple 4** : Chromatographie sur phényl Sepharose, puis sur hydroxyapatite comme premier stade de purification de G-CSF à grande échelle.

Le matériel de départ est un surnageant d'un bouillon de culture de lignées cellulaires humaines exprimant un GA-GCSF obtenu selon l'exemple 2 mais en utilisant un bioréacteur de 100 litres et le milieu sans sérum de veau. 10,5 litres de surnageant, préalablement concentré par ultra-filtration puis conservé à -20°C avant utilisation et correspondant à 84 litres de bouillon de départ, ont été chromatographiés sur phényl Sepharose après addition de 0,307 kg de NaCl (qsp 0,5 M), puis filtration sur papier Durieux N°127. L'analyse par SDS-PAGE du surnageant de culture filtré ainsi obtenu est montrée à la figure 7 (puits 3).

En utilisant une colonne Pharmacia XK 50/30 garnie de 500 ml de Phenyl Sepharose® Fast Flow High Substitution

(Pharmacia) conservé sous éthanol à 25 %, puis équilibrée avec une solution de NaCl 0,5 M avant utilisation, la concentration par chromatographie sur phényl Sepharose a été effectuée de la façon suivante :

5 Le surnageant concentré salé obtenu ci-dessus (conductivité  $40 \text{ mS.cm}^{-1}$ ) est appliqué sur la colonne au débit de 40 ml/mn. La colonne est ensuite éluée au même débit successivement avec 1,5 litres de NaCl 0,5M, puis avec 1,5 litres d'eau Milli-Q en recueillant l'effluent de la colonne  
10 en fractions de 20 ml. Les protéines totales et la concentration en sels sont détectées comme à l'exemple 1.

Les fractions correspondant au pic de protéine éluée par l'eau ont été analysées pour leur teneur en G-CSF par chromatographie RP-HPLC analytique et par ELISA. Les fractions  
15 contenant le G-CSF réunies (400 ml) contiennent 357 mg de GA-CSF titrés par HPLC correspondant à un rendement de 67,9 % avec une pureté de 20,6 %. La solution de phényl Sepharose de GA-GCSF ainsi obtenue a une conductivité de  $2 \text{ mS.cm}^{-1}$  à  $20^\circ\text{C}$ .

La solution de phényl Sepharose a été aussi analysée par  
20 SDS-PAGE (figure 7, puits 4). Après stabilisation par addition de Pefabloc (0,2 mg/ml) et de benzamidine (1mM), la solution a été immédiatement utilisée pour le stade suivant de chromatographie sur hydroxyapatite.

En utilisant une colonne Pharmacia XK 50/30 garnie de  
25 290 g d'hydroxyapatite Macro-Prep® Ceramic, Type II (Bio-Rad) préalablement mise en suspension dans 5 litres de tampon phosphate de sodium 1 mM à pH 6 (tampon 1 mM, pH 6), puis équilibrée par percolation de 1 litre de tampon phosphate de sodium 250 mM à pH 6 (tampon 250 mM, pH 6) au débit de  
30 50 ml/mn, puis par percolation de 5 litres du tampon 1 mM, pH 6 (générant ainsi une colonne de 500 ml d'hydroxyapatite), la chromatographie sur hydroxyapatite a été effectuée de la façon suivante :

400 ml de la solution de GA-GCSF de phényl Sepharose  
35 stabilisée obtenue ci-dessus sont appliqués sur la colonne d'hydroxyapatite au débit de 50 ml/mn. La colonne est ensuite éluée avec 1,50 litres du tampon 1 mM, pH 6 en recueillant l'effluent de colonne en fractions de 50 ml. Les protéines

totales ainsi que la conductivité de l'effluent de colonne sont détectées comme indiqué à l'exemple 1.

Les fractions recueillies ont été analysées par RP-HPLC analytique et par ELISA. Les fractions réunies (400 ml)

5 contiennent 331 mg de GA-GCSF titrés par HPLC correspondant à un rendement de chromatographie de 92,5 % avec une pureté supérieure à 90 % estimée par HPLC.

La solution d'hydroxyapatite ainsi obtenue a été aussi analysée par SDS-PAGE (figure 7, puits 5).

10 **Exemple 5** : Purification ultérieure de G-CSF après chromatographie sur hydroxyapatite.

L'exemple illustre les stades de purification ultérieure de G-CSF pouvant être utilisés après passage sur hydroxyapatite dans un procédé multistade de purification.

15 A partir d'une solution d'hydroxyapatite de GA-GCSF humain obtenue selon le procédé de l'invention, un stade de chromatographie sur un échangeur de cations, puis un stade de chromatographie de gel filtration ont été réalisés de la façon suivante :

20 1) chromatographie sur échangeur de cations.

Une colonne Pharmacia XK 26/40 garnie de 170 ml de SP Sepharose® Fast Flow (Pharmacia) a été équilibrée par lavage au débit de 13,2 ml/mn avec 1,380 litres d'eau Milli-Q, puis avec 1,380 litres de tampon acétate de sodium 20 mM à pH 5,3

25 (tampon 20 mM, pH 5,3).

390 ml de solution d'hydroxyapatite de GA-GCSF obtenue à l'exemple 4 sont appliqués sur la colonne de SP Sepharose au débit de 13,2 ml/mn. La colonne est ensuite lavée au même débit avec 414 ml de tampon 20 mM, pH 5,3, puis avec 1 litre

30 de tampon d'élution correspondant à un gradient de NaCl, variant de 0 à 250 mM dans 5 volumes de colonne (850 ml) du tampon 20 mM, pH 5,3 sur 52 minutes, en recueillant l'effluent de colonne en fractions de 13,2 ml. Par détection des protéines totales dans l'effluent de la colonne par

35 absorption à 280 nm, l'élution d'un pic de protéine est observée. Les fractions recueillies ont été analysées pour leur teneur en G-CSF par chromatographie RP-HPLC analytique et par ELISA. Les fractions réunies (237 ml) contiennent 255

mg de GA-GCSF titré par HPLC correspondant à un rendement de 78,8 % et une pureté de 98,7 %.

La solution de SP Sepharose ainsi obtenue a été aussi analysée par SDS-PAGE (figure 7, puits 6).

5 2) chromatographie par gel filtration.

220 ml de la solution de SP Sepharose de GA-GCSF obtenue ci-dessus ont été préalablement concentrés environ 10 fois par ultrafiltration dans une cellule Amicon de 300 ml équipée d'une membrane PLGC (Millipore), à + 4°C et sous une pression  
10 d'azote de 2 bars. Le concentrat UF ainsi obtenu (21 ml) contient 253 mg de GA-GCSF titré par HPLC correspondant à un rendement de 107,1 %. Le concentrat UF a été aussi analysé par SDS-PAGE (figure 7, puits 7).

Le concentrat UF a été ensuite soumis à un stade de  
15 chromatographie par gel filtration de la façon suivante : Deux colonnes Pharmacia XK 26/40, chacune garnie de 150 ml de Superdex™ 200 prep grade (Pharmacia) et équilibrée par lavage avec 1,35 litres d'eau Milli-Q au débit de 3,3 ml/mn, ont été montées en série, puis équilibrées avec 2,650 litres de  
20 tampon PBS (1X) au même débit. On obtient ainsi 265 ml de Superdex™ 200 prep grade en train de deux colonnes. 10 ml de solution concentrée de SP Sepharose de GA-GCSF obtenue ci-dessus sont appliqués sur le train de colonnes au débit de 3,3 ml/mn. Les colonnes sont ensuite lavées au même  
25 débit avec 300 ml de tampon PBS (1X). Par détection des protéines totales dans l'effluent de la colonne par absorption à 280 nm, l'élution d'un pic de protéine est observée. Les fractions recueillies ont été analysées pour leur teneur en G-CSF par chromatographie RP-HPLC analytique.  
30 Les fractions réunies (42,9 ml) contiennent 85,3 mg de GA-GCSF titré par HPLC correspondant à un rendement de 70,7 % et une pureté supérieure à 99 %.

De la même façon, 10 ml de la solution concentrée de SP Sepharose de GA-GCSF obtenue ci-dessus sont chromatographiés  
35 par gel filtration dans les conditions indiquées ci-dessus, mais en utilisant un tampon acétate de sodium 20 mM, pH 5,5, Tween® 20 (0,005 %) au lieu du tampon PBS (1X). Les fractions réunies (42,9 ml) contiennent 95,4 mg de GA-GCSF titré par

HPLC correspondant à un rendement de 79,1 % et une pureté supérieure à 99 %.

La figure 7 montre l'analyse par SDS-PAGE de la solution de gel filtration obtenue respectivement dans le tampon PBS 5 (puits 9) et dans le tampon acétate, pH 5,5 (puits 11).



REVENDICATIONS

- 1) Procédé de purification de G-CSF à partir d'un échantillon biologique comprenant les stades de
  - a) réduire le volume de l'échantillon biologique contenant le G-CSF par chromatographie par interaction hydrophobe pour obtenir une fraction concentrée, dessalée et enrichie,
  - b) passer la fraction concentrée sur hydroxyapatite dans des conditions où le G-CSF est faiblement lié pour obtenir une fraction concentrée, dessalée et enrichie contenant le G-CSF et
  - c) recueillir le G-CSF.
- 2) Procédé selon la revendication 1 dans lequel le G-CSF recueilli a une pureté d'au moins 90 %.
- 3) Procédé selon la revendication 1 dans lequel l'échantillon biologique est un surnageant de culture cellulaire.
- 4) Procédé selon la revendication 1 dans lequel le G-CSF est un G-CSF humain (h G-CSF).
- 5) Procédé selon la revendication 1 dans lequel le stade de réduction de volume comprend la mise en contact de l'échantillon biologique sur un support de chromatographie par interaction hydrophobe de type phényle dans des conditions permettant la fixation du G-CSF, puis son élution.
- 6) Procédé selon la revendication 5 dans lequel le support de type phényle est un Phenyl Sepharose®.
- 7) Procédé selon la revendication 6 dans lequel la fixation sur Phenyl Sepharose® est effectuée dans un tampon ayant une force ionique comprise entre 0 et 60 mSi et l'élution est effectuée par diminution de la force ionique ou de la concentration en sel dans le tampon de fixation.
- 8) Procédé selon la revendication 6 dans lequel la fixation sur Phenyl Sepharose® est effectuée dans un tampon contenant du NaCl à une concentration comprise entre 0,1 et 1 M.
- 9) Procédé selon la revendication 8 dans lequel la fixation sur Phenyl Sepharose® est effectuée dans un tampon contenant du NaCl à une concentration comprise entre 0,1 et 0,5 M et l'élution est effectuée par de l'eau.
- 10) Procédé selon la revendication 1 dans lequel le stade de passage sur hydroxyapatite est effectué dans un tampon de

force ionique comprise entre 2 et 30 mSi et à un pH compris entre 5,5 et 7,5.

11) Procédé selon la revendication 10 dans lequel le tampon comprend du phosphate à une concentration comprise entre 1 et 5 10 mM.

12) Procédé selon la revendication 10 dans lequel le tampon est un tampon phosphate 1 mM et le pH est compris entre 6,0 et 7,5.

13) Procédé de purification de G-CSF pouvant être inclus 10 dans un procédé multistade de purification du G-CSF à partir d'un échantillon biologique comprenant les stades de

a) réduire le volume de l'échantillon biologique contenant le G-CSF par chromatographie par interaction hydrophobe pour obtenir une fraction concentrée, dessalée et enrichie,

15 b) passer la fraction concentrée sur hydroxyapatite dans des conditions où le G-CSF est faiblement lié pour obtenir une fraction concentrée, dessalée et enrichie contenant le G-CSF et

c) recueillir le G-CSF.

20 14) Procédé selon la revendication 13 dans lequel le procédé multistade comprend en outre un ou plusieurs stades de chromatographie choisis parmi le groupe constitué de chromatographie d'échange d'ions, de gel filtration, de phase inverse ou d'affinité.

25 15) Procédé pour éliminer des protéines contaminantes à partir d'une solution contenant du G-CSF et des protéines contaminantes comprenant

a) le passage de la solution sur hydroxyapatite par lequel les protéines contaminantes sont fixées à l'hydroxyapatite et

30 le G-CSF est faiblement lié et

b) l'élution du G-CSF.

16) Procédé selon la revendication 15 dans lequel l'élution du G-CSF est effectuée par simple lavage avec le tampon de fixation.

35 17) Procédé selon la revendication 15 dans lequel la solution contenant le G-CSF est préparée par chromatographie par interaction hydrophobe d'un échantillon biologique contenant du G-CSF.

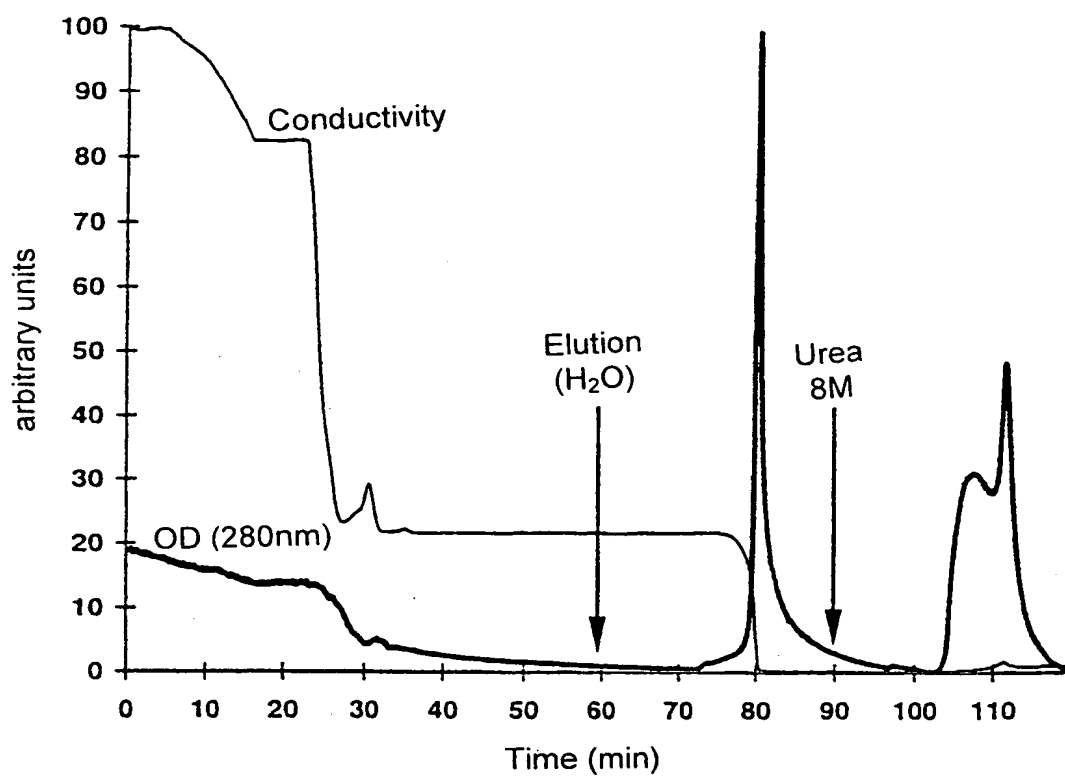
Phenyl-Sepharose

FIGURE 1

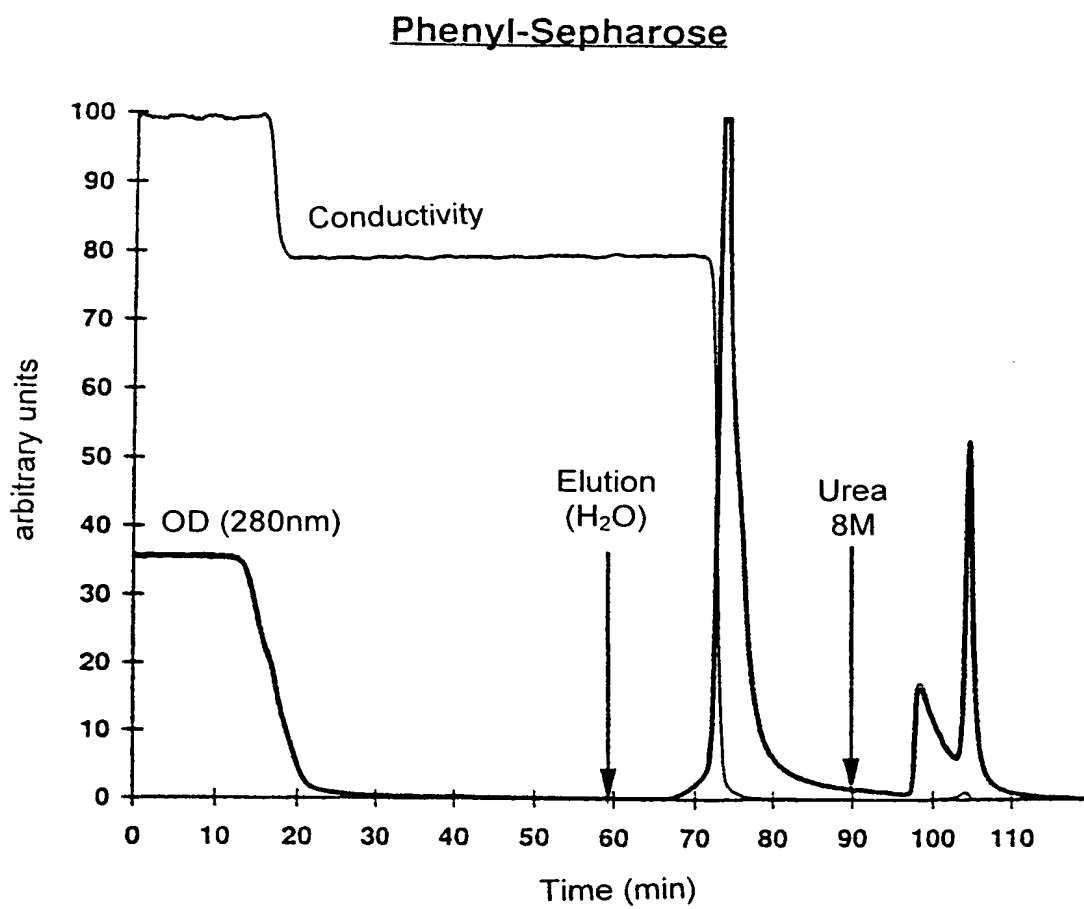


FIGURE 2

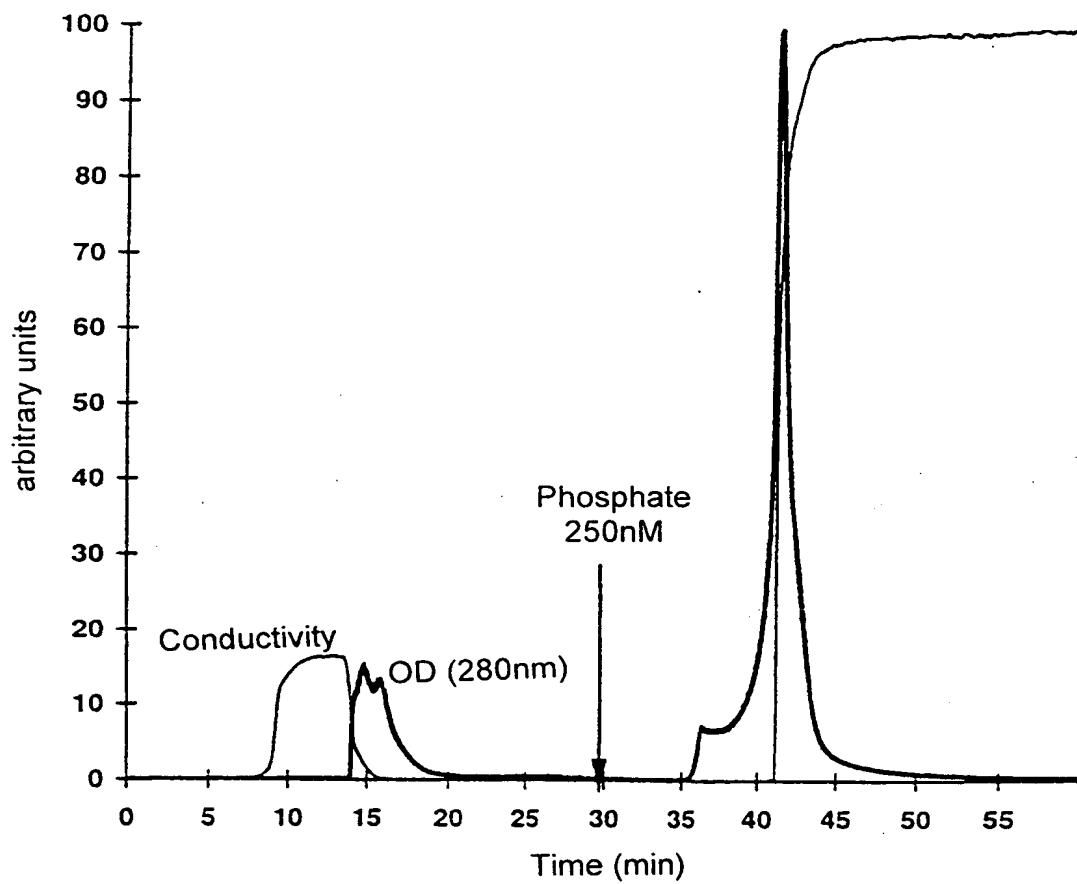
Hydroxyapatite

FIGURE 3

OD (214nm)

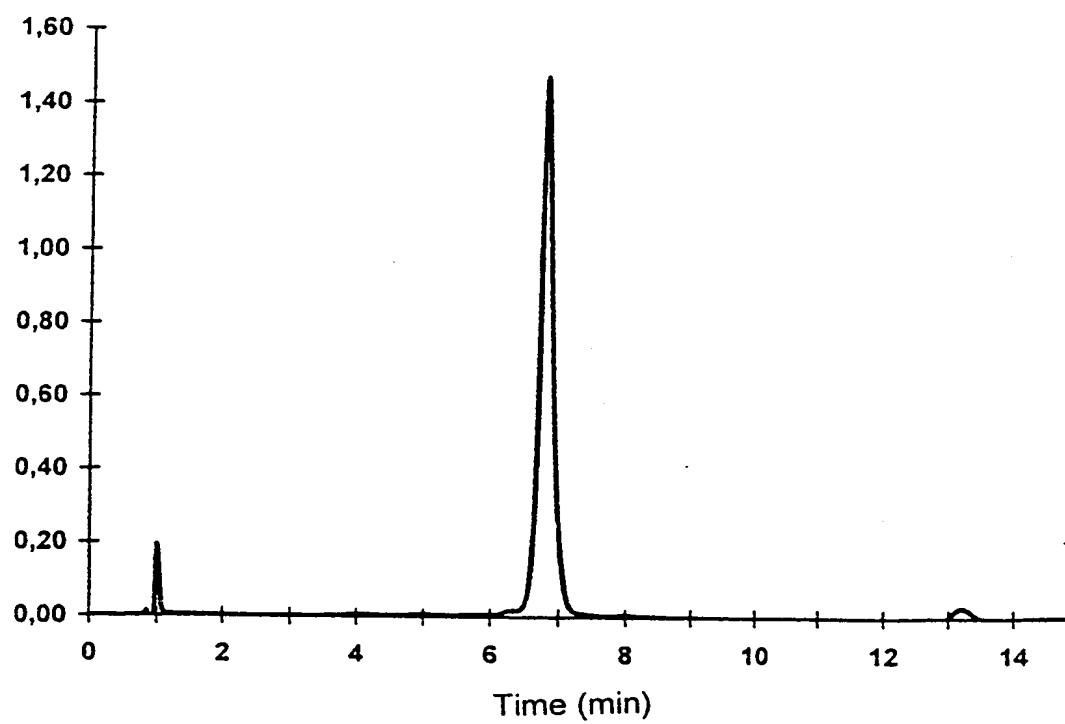


FIGURE 4

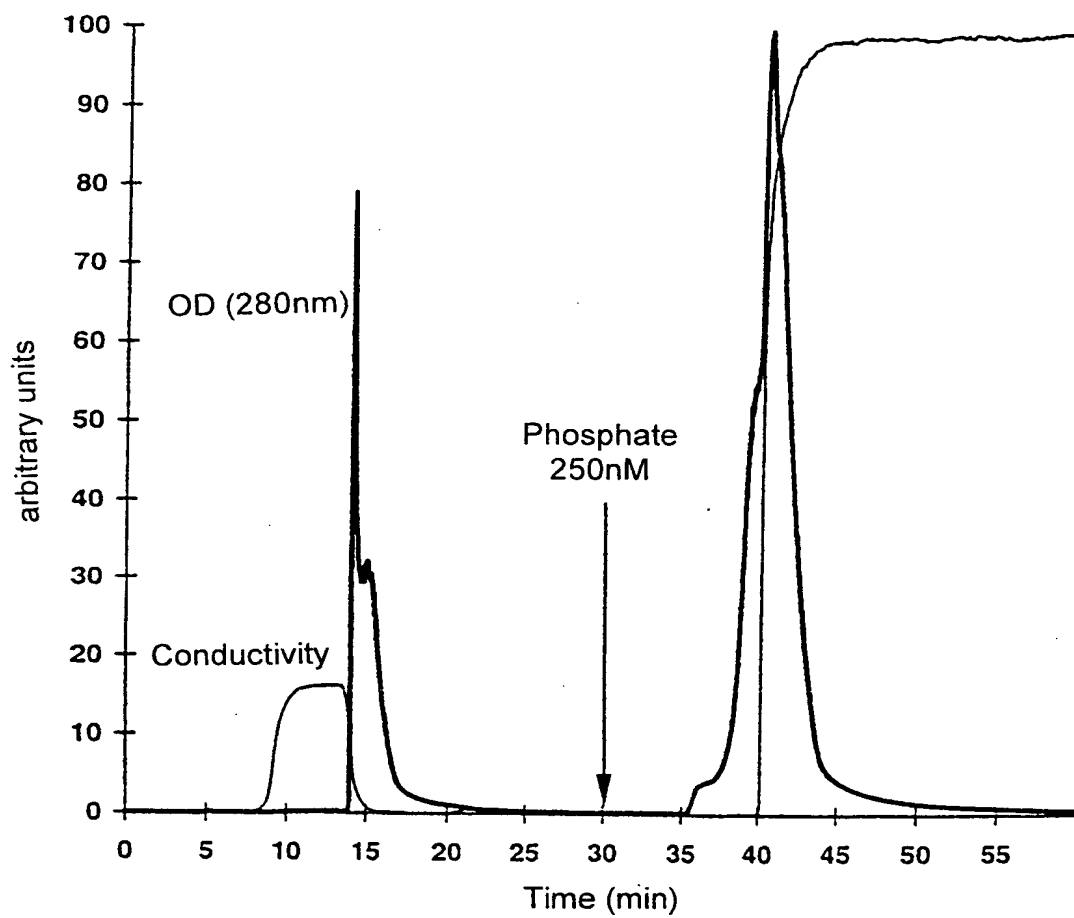
Hydroxyapatite

FIGURE 5

OD (214nm)

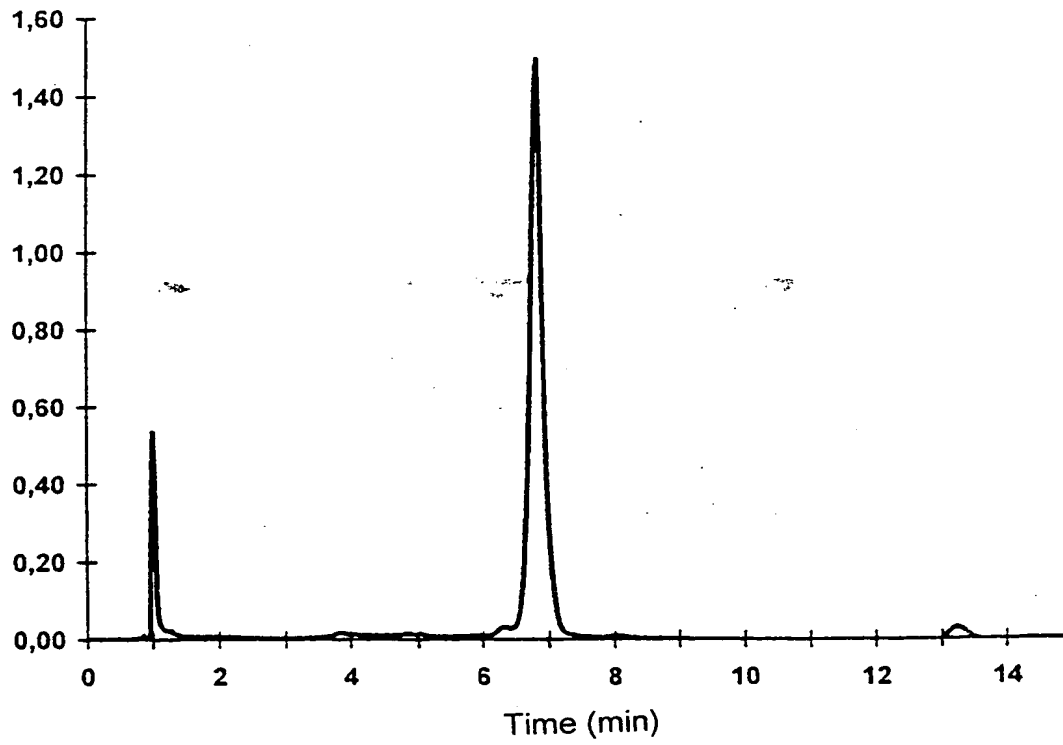


FIGURE 6



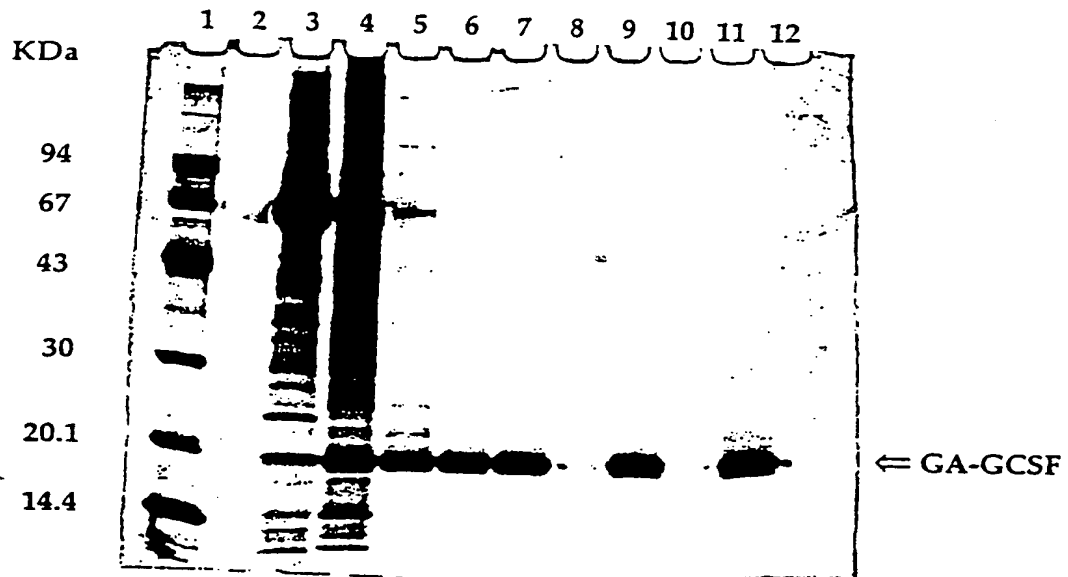


FIGURE 7

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/FR 00/01937

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C07K14/535 C07K1/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)  
BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, MEDLINE, EMBASE

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1983 NICOLA N A ET AL: "PURIFICATION OF A FACTOR INDUCING DIFFERENTIATION IN MURINE MYELO MONOCYTIC LEUKEMIA CELLS IDENTIFICATION AS GRANULOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR" Database accession no. PREV198478000619 XP002133879 cited in the application abstract &amp; JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 1983, vol. 258, no. 14, 1983, pages 9017-9023, ISSN: 0021-9258</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 November 2000

Date of mailing of the international search report

15/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cervigni, S

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/FR 00/01937

## C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1995 ARAKAWA TSUTOMU ET AL: "Structure and activity of granulocyte colony-stimulating factor derived from CHO cells containing cDNA coding for alternatively spliced sequences." Database accession no. PREV199598171086 XP002133880 cited in the application abstract &amp; ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS 1995, vol. 316, no. 1, 1995, pages 285-289, ISSN: 0003-9861</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>US 5 861 150 A (KOTHS KIRSTON ET AL) 19 January 1999 (1999-01-19) column 7, paragraph 2</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>WO 88 08003 A (CETUS CORP) 20 October 1988 (1988-10-20) page 14, line 10 - line 15; claim 9</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1986 ISHIZAKA Y ET AL: "MODE OF ACTION OF HUMAN URINARY COLONY-STIMULATING FACTOR" Database accession no. PREV198681069383 XP002133881 abstract &amp; EXPERIMENTAL HEMATOLOGY (NEW YORK) 1986, vol. 14, no. 1, 1986, pages 1-8, ISSN: 0301-472X</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>GRAHAME D A ET AL: "CARBON MONOXIDE DEHYDROGENASE FROM METHANOSARCINA-BARKERI DISAGGREGATION PURIFICATION AND PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF THE ENZYME" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 1987, vol. 262, no. 8, 1987, pages 3706-3712, XP002133877 ISSN: 0021-9258</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>FARRAR J J ET AL: "BIOCHEMICAL RELATIONSHIP OF THYMOCYTE MITOGENIC FACTOR AND FACTORS ENHANCING HUMORAL AND CELL MEDIATED IMMUNE RESPONSES" JOURNAL OF IMMUNOLOGY 1978. * EN *, vol. 121, no. 4, 1978, pages 1353-1360, XP002133878 ISSN: 0022-1767</p> <p style="text-align: center;">---</p>	

-/--

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/FR 00/01937

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>NOMURA H ET AL: "PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF HUMAN GRANULOCYTE COLONY-STIMULATING FACTOR (G-CSF)"  EMBO JOURNAL, GB, IRL PRESS, EYNSHAM,  vol. 5, no. 5, 1 May 1986 (1986-05-01),  pages 871-876, XP000650289  ISSN: 0261-4189</p> <p>-----</p>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/01937

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5861150 A	19-01-1999	US 5651963 A	29-07-1997
		US 4929700 A	29-05-1990
		CA 1339757 A	17-03-1998
		AT 167192 T	15-06-1998
		AU 610182 B	16-05-1991
		AU 1712488 A	04-11-1988
		BG 49827 A	14-02-1992
		DE 3856203 D	16-07-1998
		DE 3856203 T	08-10-1998
		DK 701788 A	16-02-1989
		EP 0309569 A	05-04-1989
		EP 0818466 A	14-01-1998
		FI 885807 A, B,	15-12-1988
		IL 86090 A	15-03-1993
		JP 1503440 T	22-11-1989
		JP 2656964 B	24-09-1997
		NO 300067 B	01-04-1997
		WO 8808003 A	20-10-1988
		ZA 8802707 A	27-12-1989
WO 8808003 A	20-10-1988	AT 167192 T	15-06-1998
		AU 610182 B	16-05-1991
		AU 1712488 A	04-11-1988
		BG 49827 A	14-02-1992
		CA 1339757 A	17-03-1998
		DE 3856203 D	16-07-1998
		DE 3856203 T	08-10-1998
		DK 701788 A	16-02-1989
		EP 0309569 A	05-04-1989
		EP 0818466 A	14-01-1998
		FI 885807 A, B,	15-12-1988
		IL 86090 A	15-03-1993
		JP 1503440 T	22-11-1989
		JP 2656964 B	24-09-1997
		NO 300067 B	01-04-1997
		US 4929700 A	29-05-1990
		US 5651963 A	29-07-1997
		US 5861150 A	19-01-1999
		ZA 8802707 A	27-12-1989

**LAW OFFICES**  
**FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW, GARRETT & DUNNER, L.L.P.**  
1300 I Street, N.W.  
Washington, DC 20005-3315

Telephone  
(202) 408-4000

Facsimile  
(202) 408-4400

**FACSIMILE TRANSMITTAL**

**TO:**

**Name:** S. AHNMED

**Firm:** US PTO

**Fax No.:** (703) 305-3230

**Your Ref.:** 10/030,230

**Our Ref.:** 03806.0531

**FROM:**

**Name:** Matthew T. Latimer

**Phone No.:** (571) 203-2714

**Fax # Verified by:** M. Latimer

**# Pages (incl. this):** 7

**Date:** January 14, 2003

**Confirmation Copy to Follow:** No

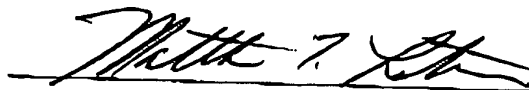
Message:

**ATTN:** S. AHNMED

Following up on our telephone conversation, attached is the IPER 409 for this application. Please give me a call if you need anything further.

Certificate of Transmission Under 37 C.F.R. § 1.8

I hereby certify that this correspondence is being facsimile transmitted to the U.S. Patent and Trademark Office, Fax No. (703) 305-3230, on January 14, 2002.



Matthew T. Latimer  
Reg. No. 44,204

If there is a problem with this transmission, notify fax room at (202) 408-4174 or the sender at the number above.

This facsimile is intended only for the individual to whom it is addressed and may contain information that is privileged, confidential, or exempt from disclosure under applicable law. If you have received this facsimile in error, please notify the sender immediately by telephone (collect), and return the original message by first-class mail to the above address.

## PATENT CO-OPERATION TREATY

Issued by: THE INTERNATIONAL  
PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

**PCT**  
**NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF**  
**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION**  
**REPORT**  
(rule 71.1 of the PCT)

Addressee:

VIEILLEFOSSE, Jean-Claude  
AVENTIS PHARMA S.A.  
102, ROUTE DE NOISY  
FR-93235 ROMAINVILLE CEDEX  
FRANCE

Date of issue

(day/month/year) 30.10.2001

File reference of the applicant or of the authorized agent  
2520/PCT

**IMPORTANT COMMUNICATION**

International application no.

PCT/FR00/01937

International filing date (day/month/year)

06/07/2000

Priority date (day/month/year)

08/07/1999

Applicant

AVENTIS PHARMA S.A. et al..

1. The applicant is hereby advised that the international preliminary examining authority has produced the international preliminary examination report for the international application and is sending it to him in the attached together with its annexes where appropriate.
2. A copy of the present report and, where appropriate, of its annexes is being sent to the International Office for communication to all the elected offices.
3. If any elected office so requires, the International Office will produce an English translation of the report (except for the annexes to the latter) and will send it to the offices concerned.

**4. REMINDER**

In order to commence the national phase at each elected office, the applicant must carry out certain actions (filing of translation and payment of national charges) within a period of 30 months starting from the priority date (or later in the case of some offices) (article 39.1) (see also the reminder issued by the International Office in form PCT/IB/301).

When a translation of the international application has to be sent to an elected office, it must include the translation of any annex to the international preliminary examination report. The applicant is responsible for the production of the translation in question and for its direct dispatch to each elected office concerned.

For further details concerning the applicable deadlines and the requirements of the elected offices, see Volume II of the PCT Guide for Applicants.

Name and postal address of the international preliminary  
examining authority  
European Patent Office  
D-80298 Munich  
Tel. + 49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d  
Fax: + 49 89 2399 - 4465

Authorized official

Büchler, S

Tel. +49 89 2399-8090

[Stamp]

## PATENT CO-OPERATION TREATY

## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or authorized agent's file reference 2520/PCT	FOR FURTHER ACTION see notification of transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No PCT/FR00/01937	International filing date (day/month/year) 06/07/2000	Priority date (day/month/year) 08/07/1999
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K14/535		
Applicant AVENTIS PHARMA S.A. et al.		
<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT comprises 5 sheets, including the present cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> It is accompanied by ANNEXES, that is to say sheets of the description, claims or drawings which have been amended and which serve as the basis for this report or sheets containing rectifications made before this Authority responsible for the international preliminary examination (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of sheets.</p>		
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability: citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Observations on the international application</p>		
Date of submission of the request for international preliminary examination 20/01/2001	Date of completion of this report 30.10.2001	
Name and postal address of the authority responsible for the international preliminary examination European Patent Office (logo) D-80298 Munich Tel. (+49-89) 2399-0. Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Authorized officer  Halle, F  Telephone no. (+49-89) 2399 8537 [stamp]	



**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT**

International application no. PCT/FR00/01937

**I. Basis of the report**

1. This report has been drawn on the basis of the following material *(the substitute sheets which have been sent to the receiving office in response to a request made in accordance with Article 14 are considered, in this report, as having been "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments (rules 70.16 and 70.17).):*

**Description, pages:**

1-16 as originally filed

**Claims, nos.:**

1-17 as originally filed

**Drawings, sheets:**

1/7-7/7 as originally filed

2. As regards the language, all the elements indicated above were at the disposal of the administration or were furnished to it in the language in which the international application was filed, except where a contrary indication is given regarding this point.

These elements were at the disposal of the administration or were delivered to it in the following language, which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (according to rule 23.1(b)).
- ☐ the publication language of the international application (according to rule 48.3(b)).
- ☐ the translation language furnished for the purposes of the international preliminary examination report (according to rule 55.2 or 55.3)

3. As regards the nucleotide or amino acid sequences disclosed in the international application (if appropriate), the international preliminary examination report was carried out on the basis of the sequence listings:

- ☐ contained in the international application, in written form.
- ☐ filed with the international application, in computer-readable form.
- ☐ furnished to the administration later, in written form.
- ☐ furnished to the administration later, in computer-readable form.
- ☐ The declaration, according to which the sequence listing in writing and provided later does not go further than the disclosure made in the application as filed, was provided.
- ☐ The declaration, according to which the information recorded in computer readable form is identical to that of the sequence listings presented in writing, was provided.

4. The amendments have led to the revocation:

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT**

International application no. PCT/FR00/01937

☐ of the description, pages:☐ of the claims, Nos.:☐ of the drawings, pages:

5. ☐ The present report was drawn up disregarding (some of) the amendments, which were considered as going further than the disclosure of the invention as filed, as indicated hereafter (rule 70.2(c)):

*(Any amended page comprising amendments of this type must be indicated in point 1 and attached to the present report)*

6. Additional observations, if necessary:

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

**1. Statement**

Novelty

Yes: Claims 1-17  
No: Claims

Inventive step

Yes: Claims  
No: Claims 1-17

Industrial applicability

Yes: Claims 1-17  
No: Claims

**2. Citations and explanations**

**see separate sheet**

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT – SEPARATE SHEET**

International application no. PCT/FR00/01937

**Point V**

1. In this examination report, reference is made to the following documents of the international search report:

D1: Database Biosis, AN: PREV199598171086

(concerning the publication "Archives of Biochemistry and Biophysics, 1995, Arakawa et al" (cited in the application))

D2: US 5 861 150

2. Taking the state of the art into account, the subject-matter of claims 1-17 may be regarded as novel (Article 33(2) PCT).

The invention relates to a purification process for the granulocyte colony stimulating factor (G-CSF). In this process, the G-CSF factor is weakly bound to the hydroxyapatite support while the proteins contaminating the solution containing the G-CSF are strongly bound on hydroxyapatite and retained during elution of the G-CSF factor. Such a process is not described in the state of the art.

- 2.1 However, it would appear that the subject-matter of claims 1-17 does not involve an inventive step (Article 33(3) PCT).

The state of the art represented by D1 (also cited in the application) already describes the use of hydroxyapatite as a purification tool for the G-CSF factor; however, as the applicant points out in the application (see page 4, lines 27-35), the process of the invention does not involve hydroxyapatite in the same way as the process described by Arakawa in D1 does.

In our view, as hydroxyapatite is a well known purification tool and has already been successfully used in the purification of CSF factors (see D2), and in particular G-CSF (D1), a new process involving hydroxyapatite in a different way, as defined in the present claims, is neither surprising nor unexpected, but is the result of simple routine work, furthermore without having to overcome any technical prejudice. The same is true of the other technical elements (elution buffer, pH . . . etc.) which are well known to a person skilled in the art and which feature in the claimed process. Thus, there

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
EXAMINATION REPORT – SEPARATE SHEET**

International application no. PCT/FR00/01937

seem to be no arguments which would indicate that the subject-matter of these claims involves an inventive step (Article 33(3) PCT).

3. Claims 13 and 14 are not clear, nor are they wholly based on the description (Article 6 PCT).

(a) The possibility of including the G-CSF purification process in what is called a "multistage purification" process is an objective to be achieved. Simply naming this objective without specifying the means of achieving it, i.e. without indicating the technical characteristics by which this process can be included in such a multistage purification process, is insufficient for defining the subject-matter of claim 13 (see also Rule 6.3(a) PCT).

(b) Moreover, the significance of the "multistage purification" process does not emerge from the definition of these claims and it does not seem possible, according to the terms of the description, to regard any process calling itself "multistage purification process" as being able to play a part in the claimed subject-matter. Thus, these claims are neither clear, nor wholly based on the description.

4. Contrary to the requirements of Rule 5.1(a)(ii) PCT, the description does not cite the document D2 reflecting the prior art.

\*\*\*\*\*  
\*\*\* RX REPORT \*\*\*  
\*\*\*\*\*

RECEPTION OK

TX/RX NO	5672
CONNECTION TEL	
SUBADDRESS	
CONNECTION ID	
ST. TIME	01/14 14:20
USAGE T	01'50
PGS.	7
RESULT	OK

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT

### RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire <b>2520/PCT</b>	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° <b>PCT/FR 00/ 01937</b>	Date du dépôt international(jour/mois/année) <b>06/07/2000</b>	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) <b>08/07/1999</b>
Déposant  <b>HOECHST MARION ROUSSEL</b>		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 4 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

**1. Base du rapport**

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
- ☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.
- b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

**4. En ce qui concerne le titre,**

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
- ☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

**5. En ce qui concerne l'abrégé,**

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
- ☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

**6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la Figure n°**

- ☐ suggérée par le déposant.
- ☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
- ☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☒ Aucune des figures n'est à publier.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 00/01937

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 7 C07K14/535 C07K1/20

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, MEDLINE, EMBASE

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>DATABASE BIOSIS 'en ligne! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1983 NICOLA N A ET AL: "PURIFICATION OF A FACTOR INDUCING DIFFERENTIATION IN MURINE MYELO MONOCYTIC LEUKEMIA CELLS IDENTIFICATION AS GRANULOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR" Database accession no. PREV198478000619 XP002133879 cité dans la demande abrégé &amp; JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 1983, vol. 258, no. 14, 1983, pages 9017-9023, ISSN: 0021-9258</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

7 novembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

15/11/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Cervigni, S

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>DATABASE BIOSIS 'en ligne!  BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE,  PHILADELPHIA, PA, US; 1995  ARAKAWA TSUTOMU ET AL: "Structure and  activity of granulocyte colony-stimulating  factor derived from CHO cells containing  cDNA coding for alternatively spliced  sequences."  Database accession no. PREV199598171086  XP002133880  cité dans la demande  abrégé  &amp; ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS  1995,  vol. 316, no. 1, 1995, pages 285-289,  ISSN: 0003-9861</p> <p>---</p>	
A	<p>US 5 861 150 A (KOTHS KIRSTON ET AL)  19 janvier 1999 (1999-01-19)  colonne 7, alinéa 2</p> <p>---</p>	
A	<p>WO 88 08003 A (CETUS CORP)  20 octobre 1988 (1988-10-20)  page 14, ligne 10 - ligne 15;  revendication 9</p> <p>---</p>	
A	<p>DATABASE BIOSIS 'en ligne!  BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE,  PHILADELPHIA, PA, US; 1986  ISHIZAKA Y ET AL: "MODE OF ACTION OF HUMAN  URINARY COLONY-STIMULATING FACTOR"  Database accession no. PREV198681069383  XP002133881  abrégé  &amp; EXPERIMENTAL HEMATOLOGY (NEW YORK) 1986,  vol. 14, no. 1, 1986, pages 1-8,  ISSN: 0301-472X</p> <p>---</p>	
A	<p>GRAHAME D A ET AL: "CARBON MONOXIDE  DEHYDROGENASE FROM METHANOSARCINA-BARKERI  DISAGGREGATION PURIFICATION AND  PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF THE ENZYME"  JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 1987,  vol. 262, no. 8, 1987, pages 3706-3712,  XP002133877  ISSN: 0021-9258</p> <p>---</p>	
A	<p>FARRAR J J ET AL: "BIOCHEMICAL  RELATIONSHIP OF THYMOCYTE MITOGENIC FACTOR  AND FACTORS ENHANCING HUMORAL AND CELL  MEDIATED IMMUNE RESPONSES"  JOURNAL OF IMMUNOLOGY 1978. * EN *,  vol. 121, no. 4, 1978, pages 1353-1360,  XP002133878  ISSN: 0022-1767</p> <p>---</p>	



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

T/FR 00/01937

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>NOMURA H ET AL: "PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF HUMAN GRANULOCYTE COLONY-STIMULATING FACTOR (G-CSF)"  EMBO JOURNAL, GB, IRL PRESS, EYNSHAM,  vol. 5, no. 5, 1 mai 1986 (1986-05-01),  pages 871-876, XP000650289  ISSN: 0261-4189</p> <p>-----</p>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

T/FR 00/01937

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5861150	A	19-01-1999	US 5651963 A	29-07-1997
			US 4929700 A	29-05-1990
			CA 1339757 A	17-03-1998
			AT 167192 T	15-06-1998
			AU 610182 B	16-05-1991
			AU 1712488 A	04-11-1988
			BG 49827 A	14-02-1992
			DE 3856203 D	16-07-1998
			DE 3856203 T	08-10-1998
			DK 701788 A	16-02-1989
			EP 0309569 A	05-04-1989
			EP 0818466 A	14-01-1998
			FI 885807 A, B,	15-12-1988
			IL 86090 A	15-03-1993
			JP 1503440 T	22-11-1989
			JP 2656964 B	24-09-1997
			NO 300067 B	01-04-1997
			WO 8808003 A	20-10-1988
			ZA 8802707 A	27-12-1989
<hr/>				
WO 8808003	A	20-10-1988	AT 167192 T	15-06-1998
			AU 610182 B	16-05-1991
			AU 1712488 A	04-11-1988
			BG 49827 A	14-02-1992
			CA 1339757 A	17-03-1998
			DE 3856203 D	16-07-1998
			DE 3856203 T	08-10-1998
			DK 701788 A	16-02-1989
			EP 0309569 A	05-04-1989
			EP 0818466 A	14-01-1998
			FI 885807 A, B,	15-12-1988
			IL 86090 A	15-03-1993
			JP 1503440 T	22-11-1989
			JP 2656964 B	24-09-1997
			NO 300067 B	01-04-1997
			US 4929700 A	29-05-1990
			US 5651963 A	29-07-1997
			US 5861150 A	19-01-1999
			ZA 8802707 A	27-12-1989
<hr/>				